

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal, EMBASE, MEDLINE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 99 13102 A (BERTLING WOLF ;KOSAK HANS (DE); NOVEMBER AG NOVUS MEDICATUS BE (DE) 18. März 1999 (1999-03-18) ganze Dok., besonders Ansprüche ---	
A	WO 94 04918 A (SLATER JAMES HOWARD ;MINTON JOHN EDWARD (GB)) 3. März 1994 (1994-03-03) in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche.19 ff.; Seite .22 ff. beson.. S.27 Z.20ff. und S.29, Z.15ff. ---	
A	EP 0 794 261 A (GULL LAB INC) 10. September 1997 (1997-09-10) siehe ganzes Dokument, besond. Seite 4, zeile 1 ff. und Ansprüche --- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. Januar 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

07/02/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mueller, F

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 97 07235 A (ABBOTT LAB) 27. Februar 1997 (1997-02-27) siehe ganzes Dokument, besond. Ansprüche ---	
A	WO 90 14441 A (CETUS CORP) 29. November 1990 (1990-11-29) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	
A	SANDHU ET AL: "Dual assymetric PCR: One-step construction of synthetic genes" BIOTECHNIQUES,US,EATON PUBLISHING, NATICK, Bd. 12, Nr. 1, 1992, Seiten 14-16, XP002134139 ISSN: 0736-6205 Siehe ganzes Dok.,beson. S.14;2.Spalte, 1.Par. ---	
A	WO 94 12632 A (UNIV LONDON ;PRODROMOU CHRISOSTOMOS (GB); PEARL LAURENCE HARRIS (G) 9. Juni 1994 (1994-06-09) siehe Ansprüche und Abbildungen ---	
A	US 5 866 336 A (NAZARENKO IRINA A ET AL) 2. Februar 1999 (1999-02-02) in der Anmeldung erwähnt siehe beson. Ansprüche und Abbild. ---	
A	SANO T ET AL: "Deoxyribonucleic acids as unique markers in molecular detection" GENETIC ANALYSIS: BIOMOLECULAR ENGINEERING,US,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHING, Bd. 14, Nr. 2, 1. Juli 1997 (1997-07-01), Seiten 37-40, XP004126263 ISSN: 1050-3862 das ganze Dokument -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

/DE 00/01674

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9913102	A	18-03-1999	DE 19738816 A AU 1140699 A EP 1007741 A	11-03-1999 29-03-1999 14-06-2000
WO 9404918	A	03-03-1994	AT 155885 T AU 690076 B AU 4970893 A CA 2143339 A DE 69312498 D DE 69312498 T DK 657028 T EP 0657028 A ES 2107193 T GR 3025156 T HK 1001738 A SG 47622 A US 5643728 A	15-08-1997 23-04-1998 15-03-1994 03-03-1994 04-09-1997 05-02-1998 16-02-1998 14-06-1995 16-11-1997 27-02-1998 03-07-1998 17-04-1998 01-07-1997
EP 0794261	A	10-09-1997	US 5723294 A JP 9329549 A US 5861256 A	03-03-1998 22-12-1997 19-01-1999
WO 9707235	A	27-02-1997	CA 2229226 A EP 0845047 A JP 11502124 T	27-02-1997 03-06-1998 23-02-1999
WO 9014441	A	29-11-1990	AT 142274 T AU 643217 B AU 5741990 A CA 2017211 A DE 69028402 D DE 69028402 T DK 477220 T EP 0477220 A ES 2091243 T JP 4505708 T JP 3082942 B US 5451505 A	15-09-1996 11-11-1993 18-12-1990 22-11-1990 10-10-1996 17-04-1997 21-10-1996 01-04-1992 01-11-1996 08-10-1992 04-09-2000 19-09-1995
WO 9412632	A	09-06-1994	NONE	
US 5866336	A	02-02-1999	AU 3728597 A CA 2260973 A EP 0912597 A WO 9802449 A US 6117635 A US 6090552 A	09-02-1998 22-01-1998 06-05-1999 22-01-1998 12-09-2000 18-07-2000

INTERNATIONALE RESEARCHERBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/01674

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal, EMBASE, MEDLINE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 99 13102 A (BERTLING WOLF ;KOSAK HANS (DE); NOVEMBER AG NOVUS MEDICATUS BE (DE) 18. März 1999 (1999-03-18) ganze Dok., besonders Ansprüche	
A	WO 94 04918 A (SLATER JAMES HOWARD ;MINTON JOHN EDWARD (GB)) 3. März 1994 (1994-03-03) in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche.19 ff.; Seite .22 ff. beson.. S.27 Z.20ff. und S.29, Z.15ff.	
A	EP 0 794 261 A (GULL LAB INC) 10. September 1997 (1997-09-10) siehe ganzes Dokument, besond. Seite 4, zeile 1 ff. und Ansprüche	
	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. Januar 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

07/02/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mueller, F

INTERNATIONAL RESEARCH REPORT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/01674

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 97 07235 A (ABBOTT LAB) 27. Februar 1997 (1997-02-27) siehe ganzes Dokument, besond. Ansprüche ----	
A	WO 90 14441 A (CETUS CORP) 29. November 1990 (1990-11-29) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----	
A	SANDHU ET AL: "Dual assymetric PCR: One-step construction of synthetic genes" BIOTECHNIQUES,US,EATON PUBLISHING, NATICK, Bd. 12, Nr. 1, 1992, Seiten 14-16, XP002134139 ISSN: 0736-6205 Siehe ganzes Dok., beson. S.14;2.Spalte, 1.Par. ----	
A	WO 94 12632 A (UNIV LONDON ;PRODROMOU CHRISOSTOMOS (GB); PEARL LAURENCE HARRIS (G) 9. Juni 1994 (1994-06-09) siehe Ansprüche und Abbildungen ----	
A	US 5 866 336 A (NAZARENKO IRINA A ET AL) 2. Februar 1999 (1999-02-02) in der Anmeldung erwähnt siehe beson. Ansprüche und Abbild. ----	
A	SANO T ET AL: "Deoxyribonucleic acids as unique markers in molecular detection" GENETIC ANALYSIS: BIOMOLECULAR ENGINEERING,US,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHING, Bd. 14, Nr. 2, 1. Juli 1997 (1997-07-01), Seiten 37-40. XP004126263 ISSN: 1050-3862 das ganze Dokument -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/DE 00/01674

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal, EMBASE, MEDLINE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
------------	--	----------------------

A	WO 99 13102 A (BERTLING WOLF ;KOSAK HANS (DE); NOVEMBER AG NOVUS MEDICATUS BE (DE) 18 March 1999 (1999-03-18) the whole document, in particular the claims ---	
---	--	--

A	WO 94 04918 A (SLATER JAMES HOWARD ;MINTON JOHN EDWARD (GB)) 3 March 1994 (1994-03-03) cited in the application see claims 19 ff; page 22 ff. in particular page 27, line 20 ff and page 29, line 15 ff. ---	
---	---	--

A	EP 0 794 261 A (GULL LAB INC) 10 September 1997 (1997-09-10) see the whole document, in particular page 4, line 1 ff and the claims ---	
---	---	--

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

* & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 January 2001

Date of mailing of the international search report

07/02/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mueller, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/DE 00/01674

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 97 07235 A (ABBOTT LAB) 27 February 1997 (1997-02-27) see the whole document, in particular the claims ---</p>	
A	<p>WO 90 14441 A (CETUS CORP) 29 November 1990 (1990-11-29) cited in the application the whole document ---</p>	
A	<p>SANDHU ET AL: "Dual assymmetric PCR: One-step construction of synthetic genes" BIOTECHNIQUES,US,EATON PUBLISHING, NATICK, vol. 12, no. 1, 1992, pages 14-16, XP002134139 ISSN: 0736-6205 see the whole document, in particular page 14; column 2, paragraph 1 ---</p>	
A	<p>WO 94 12632 A (UNIV LONDON ;PRODROMOU CHRISOSTOMOS (GB); PEARL LAURENCE HARRIS (G) 9 June 1994 (1994-06-09) see claims and figures ---</p>	
A	<p>US 5 866 336 A (NAZARENKO IRINA A ET AL) 2 February 1999 (1999-02-02) cited in the application see in particular, claims and figures ---</p>	
A	<p>SANO T ET AL: "Deoxyribonucleic acids as unique markers in molecular detection" GENETIC ANALYSIS: BIOMOLECULAR ENGINEERING,US,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHING. vol. 14, no. 2. 1 July 1997 (1997-07-01). pages 37-40, XP004126263 ISSN: 1050-3862 the whole document -----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int Application No

PCT/DE 00/01674

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9913102 A	18-03-1999	DE 19738816 A AU 1140699 A EP 1007741 A	11-03-1999 29-03-1999 14-06-2000
WO 9404918 A	03-03-1994	AT 155885 T AU 690076 B AU 4970893 A CA 2143339 A DE 69312498 D DE 69312498 T DK 657028 T EP 0657028 A ES 2107193 T GR 3025156 T HK 1001738 A SG 47622 A US 5643728 A	15-08-1997 23-04-1998 15-03-1994 03-03-1994 04-09-1997 05-02-1998 16-02-1998 14-06-1995 16-11-1997 27-02-1998 03-07-1998 17-04-1998 01-07-1997
EP 0794261 A	10-09-1997	US 5723294 A JP 9329549 A US 5861256 A	03-03-1998 22-12-1997 19-01-1999
WO 9707235 A	27-02-1997	CA 2229226 A EP 0845047 A JP 11502124 T	27-02-1997 03-06-1998 23-02-1999
WO 9014441 A	29-11-1990	AT 142274 T AU 643217 B AU 5741990 A CA 2017211 A DE 69028402 D DE 69028402 T DK 477220 T EP 0477220 A ES 2091243 T JP 4505708 T JP 3082942 B US 5451505 A	15-09-1996 11-11-1993 18-12-1990 22-11-1990 10-10-1996 17-04-1997 21-10-1996 01-04-1992 01-11-1996 08-10-1992 04-09-2000 19-09-1995
WO 9412632 A	09-06-1994	NONE	
US 5866336 A	02-02-1999	AU 3728597 A CA 2260973 A EP 0912597 A WO 9802449 A US 6117635 A US 6090552 A	09-02-1998 22-01-1998 06-05-1999 22-01-1998 12-09-2000 18-07-2000

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inte ... es Aktenzeichen

PCT/DE 00/01674

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9913102 A	18-03-1999	DE 19738816 A	11-03-1999
		AU 1140699 A	29-03-1999
		EP 1007741 A	14-06-2000
WO 9404918 A	03-03-1994	AT 155885 T	15-08-1997
		AU 690076 B	23-04-1998
		AU 4970893 A	15-03-1994
		CA 2143339 A	03-03-1994
		DE 69312498 D	04-09-1997
		DE 69312498 T	05-02-1998
		DK 657028 T	16-02-1998
		EP 0657028 A	14-06-1995
		ES 2107193 T	16-11-1997
		GR 3025156 T	27-02-1998
		HK 1001738 A	03-07-1998
		SG 47622 A	17-04-1998
		US 5643728 A	01-07-1997
EP 0794261 A	10-09-1997	US 5723294 A	03-03-1998
		JP 9329549 A	22-12-1997
		US 5861256 A	19-01-1999
WO 9707235 A	27-02-1997	CA 2229226 A	27-02-1997
		EP 0845047 A	03-06-1998
		JP 11502124 T	23-02-1999
WO 9014441 A	29-11-1990	AT 142274 T	15-09-1996
		AU 643217 B	11-11-1993
		AU 5741990 A	18-12-1990
		CA 2017211 A	22-11-1990
		DE 69028402 D	10-10-1996
		DE 69028402 T	17-04-1997
		DK 477220 T	21-10-1996
		EP 0477220 A	01-04-1992
		ES 2091243 T	01-11-1996
		JP 4505708 T	08-10-1992
		JP 3082942 B	04-09-2000
		US 5451505 A	19-09-1995
WO 9412632 A	09-06-1994	KEINE	
US 5866336 A	02-02-1999	AU 3728597 A	09-02-1998
		CA 2260973 A	22-01-1998
		EP 0912597 A	06-05-1999
		WO 9802449 A	22-01-1998
		US 6117635 A	12-09-2000
		US 6090552 A	18-07-2000

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

77

Applicant's or agent's file reference 401087GA-EH-we	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE00/01674	International filing date (day/month/year) 22 May 2000 (22.05.00)	Priority date (day/month/year) 22 July 1999 (22.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68		
Applicant NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet. <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 13 February 2001 (13.02.01)	Date of completion of this report 22 November 2001 (22.11.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE00/01674

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

☐ the international application as originally filed

☒ the description:
 pages 1-16, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

☒ the claims:
 pages 1-21, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

☒ the drawings:
 pages 1/10-10/10, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
 These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
☐ filed together with the international application in computer readable form.
☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
☐ the claims, Nos. _____
☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 00/01674

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

This report makes reference to the following documents:

D1: WO-A-99/13102

D2: WO-A-94/04918

D3: EP-A-0 794 261

The subject matter according to Claim 1 meets the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

D3 is regarded as the closest prior art. D3 describes a method for the identification and discrimination of various analytes within a test sample using nucleic acid probes which are complementary to various target sequences. These probes carry various fluorescence markers and enable probes/target sequence complexes to be identified (see claims and examples).

In contrast to that, the subject matter of the present application is a method for marking and identifying which describes the identification of at least one identification sequence with at least two probes (completely or not completely complementary to the identification sequence) which have melting points that are to be distinguished from each other.

The subject matter of the present application can also be used for identifying a plurality of identification

sequences in a sample.

The problem to be solved by the present application therefore appears to be that of providing an identification method which permits the identification of a target sequence using at least two probes.

The use of nucleic acid target sequences for marking substances is already disclosed by the prior art. D1, for example, describes the identification (page 5, line 28 ff) of identification sequences using primer combinations, wherein only a single specific primer combination leads to exponential amplification of the identification sequence (page 9, line 24 ff). D2 also describes an identification method using nucleic acid identification sequences which contain 3' and 5' constant primer binding regions (page 27) and whose amplification products can be identified via hybridization or sequencing (page 28, line 12 ff).

The prior art does not, however, suggest the use of probes which distinguish one or more different target sequences using completely or not completely complementary hybridization.

A person skilled in the art therefore would not have anticipated modifying the identification methods known from the prior art in such a way that he or she would have arrived at the subject matter according to Claim 1.

Dependent Claims 2 to 21 also meet the requirements of PCT Article 33(2) and (3) for this reason.

The advantage of the method according to the invention is that all the identification sections used for marking can be amplified and identified in a single reaction substance (clear from the description, page 4, lines 1-4).

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not cite D3 or indicate the relevant prior art disclosed therein.

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. Claims 8, 9 and 11 do not meet the requirements of PCT Article 6. The claims describe the use of coupling groups A, B, C, D-Z. Merely listing the coupling groups does not provide any significant information, since the letters A, B, C, D-Z do not denote any technical features.
2. Claim 13 does not meet the requirements of PCT Articles 5 and 6. It is not discernable to what extent the nucleic acid sequences enclosed in particle P can be made available to the claimed identification method.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT IM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 401087GA-EH-we	WEITERES VORGEHEN Internationales Anmeldedatum <i>(Tag/Monat/Jahr)</i> 22/05/2000	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5 (Frühestes) Prioritätsdatum <i>(Tag/Monat/Jahr)</i> 22/07/1999
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 00/ 01674		
Anmelder NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 27 NOV 2001

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 401087GA-	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/01674	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 22/05/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 22/07/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 13/02/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 22.11.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Mueller, F Tel. Nr. +49 89 2399 7722 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-16 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-21 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/10-10/10 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-21
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-21
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-21
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Article 35 hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: WO9913102 A

D2: WO9404918 A

D3: EP794261 A

Der Gegenstand des Anspruchs 1 erfüllt die Anforderungen von Artikel 33(2) und 33(3) PCT.

D3 wird als nächstliegender Stand der Technik angesehen. D3 beschreibt ein Verfahren zur Erkennung und Unterscheidung von verschiedenen Analyten in einer Probe unter der Verwendung von zu verschiedenen Zielsequenzen komplementären Nukleinsäuresonden. Diese verwendeten Sonden tragen verschiedene Fluoreszenzmarker und erlauben die Erkennung von Sonden/Zielsequenzkomplexen (siehe Ansprüche und Beispiele).

Im Unterschied dazu hat die vorliegende Anmeldung ein Markierungs- und Erkennungsverfahren zum Gegenstand, welches die Erkennung von mindestens einer Identifizierungssequenz mit mindestens zwei Sonden (vollständig und nicht vollständig komplementär zur Identifizierungssequenz) beschreibt, die voneinander zu unterscheidende Schmelzpunkte aufweisen.

Der Gegenstand der vorliegenden Anmeldung ist weiterhin zur Erkennung von einer Vielzahl von Identifizierungssequenzen in einer Probe anwendbar.

Das zu lösende Problem der vorliegenden Anmeldung scheint daher die Bereitstellung eines Erkennungsverfahrens zu sein das unter Verwendung von mindestens zwei Sonden die Identifizierung einer Zielsequenz ermöglicht.

Die Verwendung von Nukleinsäurezielsequenzen zur Markierung von Substanzen ist bereits im Stand der Technik offenbart. So beschreibt z.B.: D1 die Erkennung (Seite 5, Zeile 28ff.) von Identifizierungssequenzen mit Hilfe von Primerkombinationen, wobei nur eine einzige spezifische Primerkombination zur exponentiellen Amplifizierung der Identifizierungssequenz führt (Seite 9, Zeile 24 ff.). D2 beschreibt ebenfalls ein Erkennungsverfahren mit Hilfe von Nukleinsäureerkennungssequenzen welche 3' und 5'

konstante Primerbindungsregionen beinhalten (Seite 27) und deren Amplifizierungsprodukte über Hybridisierung oder Sequenzierung (Seite 28, Zeile 12 ff.) identifiziert werden können.

Im Stand der Technik ist jedoch keinerlei Hinweis für die Verwendung von Sonden, welche über vollständige und nicht-vollständige komplementäre Hybridisierung eine oder mehrere verschiedene Zielsequenzen unterscheidbar machen zu finden. Der Fachmann hätte daher weder Veranlassung gehabt die im Stand der Technik bekannten Erkennungsverfahren so zu modifizieren, dass er zum Gegenstand des Anspruchs 1 gelangt wäre.

Deshalb kann neben Neuheit auch erfinderische Tätigkeit für den Gegenstand des Anspruchs 1 anerkannt werden.

Der selben Begründung folgend erfüllen die abhängigen Ansprüche 2-21 ebenfalls die Erfordernisse von Artikel 33(2) und 33(3) PCT.

Der Vorteil des erfindungsgemässen Verfahrens besteht darin, dass sämtliche zur Markierung verwendeten Identifizierungsabschnitte in einem einzigen Reaktionsansatz amplifizierbar und identifizierbar sind (ersichtlich aus der Beschreibung, Seite 4, Zeile 1-4).

Zu Punkt VII

Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in dem Dokument D3 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch dieses Dokument angegeben.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

1. Die Ansprüche 8,9 und 11 erfüllen nicht die Erfordernisse von Artikel 6 PCT. Die Ansprüche beschreiben die Verwendung von Kopplungsgruppen A,B,C,D-Z. Die Benennung der Kopplungsgruppen sind inhaltslos, da keine technischen

Merkmale mit den Buchstaben A,B,C,D-Z verbunden werden können.

2. Anspruch 13 erfüllt nicht die Erfordernisse von Artikel 5 und 6 PCT.
Es ist nicht ersichtlich inwieweit in Partikel P eingeschlossene
Nukleinsäuresequenzen dem beanspruchten Identifizierungsverfahren zugänglich
gemacht werden können.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 03 May 2001 (03.05.01)	
International application No. PCT/DE00/01674	Applicant's or agent's file reference 401087GA-EH-we
International filing date (day/month/year) 22 May 2000 (22.05.00)	Priority date (day/month/year) 22 July 1999 (22.07.99)
Applicant BERTLING, Wolf et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
13 February 2001 (13.02.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Kiwa Mpay Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	--

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. Februar 2001 (01.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/07645 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68

(74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nägelsbachstrasse 49A,
D-91052 Erlangen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/01674

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:
22. Mai 2000 (22.05.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 34 573.2 22. Juli 1999 (22.07.1999) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT
GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN
[DE/DE]; Ulrich-Schalk-Strasse 3a, D-91056 Erlangen (DE).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): BERTLING, Wolf
[DE/DE]; Meisenweg 22, D-91056 Erlangen (DE).
KOSAK, Hans [DE/DE]; Von-Witzleben-Strasse 23,
D-53123 Bonn (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR MARKING SOLID, LIQUID AND GASEOUS SUBSTANCES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR MARKIERUNG VON FESTEN, FLÜSSIGEN UND GASFÖRMIGEN SUBSTANZEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for marking and identifying solid, liquid and gaseous substances (S1-n). In order to carry out said marking, at least one nucleic acid sequence is selected from a first group of predefined nucleic acid sequences (N1-n) respectively possessing an identification sequence section (IDS1-n) and is added to the substance (S1-n). In order to carry out identification, a second group of other nucleic acid sequences (N'1-n) is provided, whereby said nucleic acid sequences respectively possess a detection sequence section (IDP1-n) which is complementary to one of the identification sequence sections (IDS1-n). First melting points of the hybrids which are formed from the identification sequences (IDS1-n) with the complementary detection sequence sections (IDP1-n) differ by a maximum of 5 °C and second melting points of hybrids which are not fully complementary, formed from the identification sequence sections (IDS1-n) and detection sequences (IDP1-n), are lower by more than 5 °C than the lowest first melting point. For identification purposes, the nucleic acid sequences selected from the first group (N1-n) are brought into contact with the other nucleic acid sequences (N'1-n) from the second group in predefined hybridization conditions and said hybridization is detected.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Markierung und Identifizierung von festen, flüssigen und gasförmigen Substanzen (S1-n), wobei zur Markierung aus einer ersten Gruppe vorgegebener jeweils einen Identifizierungssequenzabschnitt (IDS1-n) aufweisenden Nukleinsäuresequenzen (N1-n) mindestens eine ausgewählt und zur Substanz (S1-n) hinzugefügt wird, wobei zur Identifizierung eine zweite Gruppe weitere Nukleinsäuresequenzen (N'1-n) vorgesehen ist, die jeweils einen zu einem der Identifizierungssequenzabschnitte (IDS1-n) komplementären Nachweissequenzabschnitt (IDP1-n) aufweisen, wobei erste Schmelzpunkte von aus den Identifizierungssequenzabschnitten (IDS1-n) mit dem dazu komplementären Nachweissequenzabschnitt (IDP1-n) gebildeten, Hybriden sich um höchstens 5°C voneinander unterscheiden und zweite Schmelzpunkte von aus den Identifizierungssequenzabschnitten (IDS1-n) und Nachweissequenzabschnitten (IDP1-n) gebildeten nicht vollständig komplementären Hybriden um mehr als 5°C niedriger sind als der niedrigste der ersten Schmelzpunkte und wobei zur Identifizierung die aus der ersten Gruppe ausgewählte/n Nukleinsäuresequenz/en (N1-n) mit den weiteren Nukleinsäuresequenzen (N'1-n) der zweiten Gruppe unter vorgegebenen Hybridisierungsbedingungen in Kontakt gebracht und die Hybridisierung nachgewiesen wird.

WO 01/07645 A2

Verfahren zur Markierung von festen, flüssigen und gasförmigen Substanzen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Markierung von festen, flüssigen und gasförmigen Substanzen.

Nach dem Stand der Technik sind verschiedene Verfahren bekannt, bei denen zur Markierung Nukleinsäuresequenzen benutzt werden.

Bei dem aus der WO 90/14441 bekannten Verfahren wird eine vorgegebene spezifische Nukleinsäuresequenz amplifiziert und anschließend identifiziert.- Eine komplexe Markierung nach Art eines Codes ist damit nicht realisierbar.

In der WO 91/17265 ist ein Verfahren zur Markierung eines Materials mit Mikrospuren von DNA beschrieben. Die in geringsten Mengen vorhandene DNA wird durch eine PCR amplifiziert. Die Identifizierung der DNA erfolgt durch Sequenzierung. Der Nachweis der zur Markierung eingesetzten DNA ist langwierig und aufwendig.

Bei den in der US 5,866,336 offenbarten Verfahren wird durch Energie-Transfer zwischen Donor- und Akzeptor-Molekülen eine Ausbildung intra- oder intermolekularer Hybride nachgewiesen.

Bei der WO 94/04918 wird zur Markierung einer Flüssigkeit eine an einen Partikel gebundene Nukleinsäure benutzt. Die Nukleinsäure wird amplifiziert und z.B. mittels einer radioaktiven Markierung identifiziert.

Bei dem aus der WO 95/02702 bekannten Verfahren werden verschiedene Nukleinsäuren in Kombination mit verschiedenen Par-

tikeln verwendet. Damit läßt sich ein komplexer Markierungscode erzeugen. Zur Identifizierung werden die Nukleinsäuren mittels PCR, ggf. in Kombination mit einer Sequenzierung, amplifiziert. Zur Identifizierung des Codes ist weiter-

5 hin eine Identifizierung der Partikel und eine Kombination mit den aus den Identifizierungen gewonnenen Informationen erforderlich.

Die US 5,656,731 beschreibt eine Markierung von Antikörpern

10 mittels Nukleinsäuren. Das Vorliegen des gesuchten Antikörpers wird nach einem vorhergehenden Selektionsprozeß anhand eines Nachweises der Nukleinsäure vorgenommen. Die Nukleinsäure wird dazu amplifiziert.

15 Eine Markierung von polymeren Substanzen ist in der US 5,708,153 beschrieben. Dabei wird gleichzeitig mit der Synthese der polymeren Substanz eine die Synthese protokollierende Nukleinsäure synthetisiert. Zur Identifizierung der Zusammensetzung der polymeren Substanz wird die Nukleinsäure

20 amplifiziert und sequenziert.

Die bekannten Verfahren sind kosten- und zeitaufwendig. Soweit eine Sequenzierung zur Identifizierung der Markierung erforderlich ist, ist die Benutzung eines komplexen Markierungs-

25 codes oder die Identifizierung einer Markierung aus einer Vielzahl von Markierungen nur mit äußersten Schwierigkeiten möglich.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren anzugeben, mit

30 dem eine Vielzahl von Substanzen eindeutig markiert sowie schnell und kostengünstig identifiziert werden können.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale des Anspruchs 1 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 21.

5

Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur Markierung und Identifizierung von festen, flüssigen und gasförmigen Substanzen vorgesehen, wobei zur Markierung aus einer ersten Gruppe vorgegebener jeweils einen Markierungssequenzabschnitt aufweisender Nukleinsäuresequenzen mindestens eine ausgewählt und zur Substanz hinzugefügt wird,

wobei zur Identifizierung eine zweite Gruppe weiterer Nukleinsäuresequenzen vorgesehen ist, die jeweils einen zu einem der Identifizierungssequenzabschnitte komplementären Nachweissequenzabschnitt aufweisen,

wobei erste Schmelzpunkte von aus den Identifizierungssequenzabschnitten mit den dazu komplementären Nachweissequenzabschnitten gebildete Hybride sich um höchstens 5°C voneinander unterscheiden und

zweite Schmelzpunkte von aus den Identifizierungssequenzabschnitten und Nachweissequenzabschnitten gebildete nicht vollständig komplementäre Hybride um mehr als 5°C niedriger sind als der niedrigste der ersten Schmelzpunkte und

wobei zur Identifizierung die aus der ersten Gruppe ausgewählte/n Nukleinsäuresequenz/en mit den weiteren Nukleinsäuresequenzen der zweiten Gruppe unter vorgegebenen Hybridisierungsbedingungen in Kontakt gebracht und die Hybridisierung nachgewiesen wird.

Das Verfahren kann einfach, schnell und kostengünstig durchgeführt werden. Es ist möglich, sämtliche zur Markierung verwendeten Identifizierungsabschnitte in einem einzigen Reaktionsansatz zu amplifizieren und zu identifizieren.

5

Unter Nukleinsäuresequenzen werden hier sowohl einzel- als auch doppelsträngige Sequenzen verstanden, die im wesentlichen aus Nukleinsäuren bestehen.

10 Nach einem Ausgestaltungsmerkmal befindet sich der Identifizierungssequenzabschnitt zwischen zwei Primerbindungssequenzabschnitten. - In diesem Fall kann die Nukleinsäuresequenz einzelsträngig sein. Eine Amplifikation ist beispielsweise mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) einfach möglich.

15

Nach einer weiteren Ausgestaltung weisen jeweils zwei Nukleinsäuresequenzen einen Teilabschnitt eines gemeinsamen Identifizierungssequenzabschnitts an ihrem 5'-Ende auf und an den Teilabschnitt ist ein Primerbindungssequenzabschnitt gebunden. Bei dieser Ausgestaltungsform ist der Identifizierungssequenzabschnitt zunächst nicht vorhanden, sondern wird erst während der Amplifizierungsreaktion erzeugt. Vorteilhafterweise sind dabei die Teilabschnitte teilweise komplementär zueinander. - Das erhöht die Sicherheit der Markierung.

25

Zweckmäßigerweise weisen die Primerbindungssequenzabschnitte den gleichen Schmelzpunkt auf. Das ermöglicht eine gleichzeitige Amplifizierungsreaktion der Nukleinsäuresequenzen in einem einzigen Reaktionsansatz.

30

Die Nukleinsäuresequenzen können, vorzugsweise mittels PCR und unter Verwendung fluoreszierender Primer, amplifiziert werden. Zur Verbesserung der Stabilität der Markierung ist

vorteilhafterweise vorgesehen, daß die Nukleinsäuresequenzen an mindestens einem Ende mit einem Stoff verbunden sind, welcher einem durch Exonuklease bedingten Abbau entgegenwirkt.

- 5 Zur Erzeugung komplexer Markierungen können die Nukleinsäuresequenzen mit einer spezifischen Kopplungsgruppe versehen sein. Die Kopplungsgruppe kann aus der folgenden Gruppe ausgewählt sein: Biotin-, Amino-, Thiol-Gruppe oder Hapten. Mittel der Kopplungsgruppe kann die damit versehene Nukleinsäuresequenz spezifisch gebunden und/oder ggf. auch identifiziert werden.

- 15 Zur Identifizierung können auch weitere Primerbindungssequenzabschnitte verwendet werden. Jeder Primerbindungssequenzabschnitt kann anhand einer daran gebundenen spezifischen fluorophoren Gruppe eindeutig identifiziert werden.

- 20 Zur weiteren Erleichterung der Identifizierung kann an die Nukleinsäuresequenz ein eine fluorophore Gruppe tragendes Molekül gebunden sein.

- 25 Insbesondere bei Verwendung identischer Identifikationssequenzabschnitte können zur Identifizierung auch weitere Primerbindungssequenzabschnitte verwendet werden. Jeder der Primerbindungssequenzabschnitte kann anhand einer daran gebundenen spezifischen fluorophoren Gruppe eindeutig identifiziert werden.

- 30 Als zweckmäßig hat es sich erwiesen, die Nukleinsäuresequenz an die Substanz zu binden und als Substanz einen der folgenden Stoffe zu verwenden: Antikörper, Lektine, Rezeptoren, Nukleotid-Sequenzen, PNA-Sequenzen, Peptide, Proteine, Zucker, Liganden. Als besonders vorteilhaft wird es angesehen, die

Nukleinsäuresequenzen an Partikel zu binden oder darin einzuschließen. Die Partikel können eine Größe von 30 nm bis 3 µm aufweisen. Sie sind vorteilhafterweise Silica-, Polystyrol-, Polyvinylchlorid-, Polyethylen, Nylon- oder Glasmilch-Partikel. Das Partikel kann aber auch ein virales Kapsid oder ein virus-like-Partikel sein.- Die Verwendung von Nukleinsäuresequenzen tragenden Partikeln ist besonders vorteilhaft, weil aufgrund der Größe der Partikel eine Sortierung und Isolierung beispielsweise in einem Partikel-Sortierer möglich ist. Das Partikel kann als Träger einer Markierung an die zu markierende Substanz gebunden sein.

Zur Identifizierung hat es sich als vorteilhaft erwiesen, daß jede der weiteren Nukleinsäuresequenzen an einem vorgegebenen Ort einer festen Oberfläche, vorzugsweise auf einem Chip, einer Mikrotiterplatte oder Folie, gebunden ist. Das ermöglicht eine Entschlüsselung komplexer Markierungscodes oder einer Vielzahl von Codes in einem einzigen Verfahrensschritt.

Die Hybridisierung eines Identifizierungssequenzabschnitts mit einem komplementären Nachweissequenzabschnitt kann mittels Fluoreszenz nachgewiesen werden. Die vorgeschlagene Identifizierung ist besonders einfach erkennbar.

Nach einer weiteren Ausgestaltung ist vorgesehen, daß mindestens zwei Nukleinsäuresequenzen als Markierung der Substanz zugefügt werden. Dadurch kann mit einer geringen Anzahl unterschiedlicher Identifizierungssequenzabschnitte ein komplexer Code bereitgestellt werden.

30

Die Nukleinsäuresequenzen und/oder die weiteren Nukleinsäuresequenzen werden vorzugsweise synthetisch hergestellt.

Anstatt der Nukleinsäuresequenzen bzw. der weiteren Nukleinsäuresequenzen können auch Chimäre aus Nukleinsäuren und Nukleinsäureanaloge, wie PTO oder PNA, verwendet werden. Solche
5 Chimäre weisen eine erhöhte Stabilität gegenüber einem enzymatischen Abbau auf.

Nachfolgend werden anhand der Zeichnung Ausführungsbeispiele der Erfindung näher erläutert. Es zeigen:

10

Fig. 1 a - e die Amplifikation einer ersten Nukleinsäuresequenz,

15

Fig. 2 a - e die Amplifikation zweier zweiter Nukleinsäuresequenzen,

Fig. 3 a - d die Identifikation einer ersten Nukleinsäuresequenz mittels "molecular beacons",

20

Fig. 4 die Markierung eines Identifizierungssequenzabschnitts,

Fig. 5 a mit fluorophoren Gruppen markierte Nukleinsäuresequenzen,

25

Fig. 5 b, c einen Detektor mit den weiteren Nukleinsäuresequenzen,

Fig. 6 a - d die Selektion und Identifizierung dritter Nukleinsäuresequenzen,

30

Fig. 7 a - f die Herstellung eines komplexen Codes,

Fig. 8 a - d die Herstellung von Markierungs-Partikeln,

Fig. 9 a - d die Markierung von Molekülen mit Markierungs-
Partikeln gemäß Fig.8 und

5

Fig. 10 die Selektion und Identifizierung von mit Mar-
kierungs-Partikeln markierten Substanzen.

10 In den Fig. 1 a - e ist eine erste Nukleinsäuresequenz N(I)1
und deren Amplifikation schematisch dargestellt. Die erste
Nukleinsäuresequenz N(I)1 weist an ihrem 3'-Ende einen ersten
Primerbindungssequenzabschnitt PBS1 und an ihrem 5'-Ende ei-
nen zu einem zweiten (hier nicht gezeigten) Primerbindungsse-
quenzabschnitt PBS2 komplementären zweiten Primerbindungsse-
15 quenzabschnitt PBS'2 auf. Zwischen dem ersten PBS1 und dem
zweiten komplementären Primerbindungssequenzabschnitt PBS'2
befindet sich ein Identifizierungssequenzabschnitt IDS.

Zur Amplifikation wird die erste Nukleinsäuresequenz N(I)1
20 mit einem ersten Primer P1 und einem zweiten Primer P2 in
Kontakt gebracht. Der erste P1 und der zweite Primer P2 hy-
bridisieren mit dem dazu komplementären ersten Primerbin-
dungssequenzabschnitt PBS1 bzw. zweiten Primerbindungsse-
quenzabschnitt PBS2. Durch Polymerase werden der erste P1 und
25 der zweite Primer P2 verlängert; es wird ein zum Identifizie-
rungssequenzabschnitt IDS komplementärer Identifizierungsse-
quenzabschnitt IDS' gebildet (Fig. 1c). Der zweite Primer P2
bindet dann an die komplementäre Nukleinsäuresequenz N'(I)1
(Fig.1d). Durch die Polymerase wird nun eine doppelsträngige
30 DNA gebildet, welche den Identifizierungssequenzabschnitt IDS
enthält (Fig. 1e).

Bei dem in den Fig.2 a - e gezeigten Ausführungsbeispiel ist der Identifizierungssequenzabschnitt IDS zunächst nicht vorhanden. Eine zweite Nukleinsäuresequenz N(II)1 weist an ihrem 5'-Ende den ersten Primerbindungssequenzabschnitt PBS1 auf. 5 Daran gebunden ist ein Teilabschnitt IDS-A des gemeinsamen Identifizierungssequenzabschnitts IDS. Eine weitere zweite Nukleinsäuresequenz N(II)2 weist an ihrem 3'-Ende den zweiten Primerbindungssequenzabschnitt PBS2 auf. Daran ist ein zweiter Teilabschnitt IDS-B des Identifizierungssequenzabschnitts 10 IDS gebunden. Der erste Teilabschnitt IDS-A und der zweite Teilabschnitt IDS-B sind abschnittsweise komplementär zueinander.

Die Amplifikation ist in den Fig. 2b - e gezeigt. Der erste 15 Primer P1 und der zweite Primer P2 binden an die dazu jeweils komplementären Primersequenzabschnitte PBS1 bzw. PBS2. Durch Polymerase werden die komplementären Sequenzen des ersten IDS-A und des zweiten Teilabschnitts IDS-B synthetisiert (Fig. 2c). Diese Syntheseprodukte können in weiteren Zyklen 20 mit ihren 3'-Enden hybridisieren (Fig.2d) und verlängert werden (Fig. 2e). Es entsteht als Produkt eine Nukleinsäuresequenz, welche den vollständigen Identifizierungssequenzabschnitt IDS aufweist.

25 Bei dieser Verfahrensvariante können vorteilhafterweise im Bereich des ersten PBS1 und zweiten Primerbindungssequenzabschnitts PBS2 Nukleinsäure-Analoga, wie z.B. PNA oder PTO, verwendet werden. Solche Nukleinsäure-Analoga weisen eine erhöhte Stabilität gegenüber einem enzymatischen Abbau auf. Zur 30 weiteren Erhöhung der Stabilität kann auch das 5'-Ende der Nukleinsäuresequenz mit einem Stoff gekoppelt werden, der einen 5'-Exonuklease-Abbau verhindert. Als Stoffe eignen sich dazu z.B. PNA oder PTO.

Die Primerbindungssequenzabschnitte PBS1, PBS2 sind vorteilhafterweise so gewählt, daß die Amplifikationsreaktion in einem engen Temperaturbereich durchgeführt werden kann. Dazu werden die Primerbindungssequenzabschnitte PBS1 bzw. PBS2 so gewählt, daß sich ihre Schmelzpunkte um höchstens 5° Celsius voneinander unterscheiden. Um die Spezifität der Identifizierungsreaktion zu erhöhen ist es vorteilhaft, daß der Schmelzpunkt der Primerbindungssequenzabschnitte PBS1 bzw. PBS2 bei einer Bildung von nicht vollständig komplementären Hybriden um mehr als 5° Celsius unterhalb des niedrigsten Schmelzpunkts eines vollständig komplementären Hybrids liegt. Dadurch wird die Bildung unspezifischer Hybride während der Amplifizierung unmöglich gemacht.

Zur Identifizierung der Markierung wird der Identifizierungssequenzabschnitt IDS mit einem dazu vollständig komplementären Nachweissequenzabschnitt hybridisiert. Um die Spezifität der Identifizierungsreaktion zu erhöhen ist vorgesehen, daß sämtliche Identifizierungssequenzabschnitte IDS mit den dazu komplementären Nachweissequenzabschnitten IDP erste Schmelzpunkte aufweisen, die sich vorzugsweise um nicht mehr als 5° Celsius voneinander unterscheiden. Zur weiteren Erhöhung der Spezifität ist vorgesehen, daß jeder Schmelzpunkt eines nicht vollständigen Hybrids mit einem Identifizierungssequenzabschnitt IDS mehr als 5° Celsius unterhalb des niedrigsten Schmelzpunkts vollständig komplementärer Hybride liegt.

Zur weiteren Vereinfachung der Verfahrensführung ist außerdem vorgesehen, daß die Schmelzpunkte der Primerbindungssequenzabschnitte PBS1, PBS2 und der Identifizierungssequenzabschnitte IDS im wesentlichen gleich sind.

Nach einer weiteren Verfahrensvariante wird eine erste Nukleinsäuresequenz N(I)1 in einer Amplifizierungsreaktion vervielfältigt (Fig. 3a und b). Im Reaktionsansatz befinden sich außerdem molecular beacons, die zu den Identifizierungssequenzabschnitten komplementäre Nachweissequenzabschnitte IDP1-n aufweisen. Die molecular beacons MB sind in Form einer Haarnadelschleife ausgebildet. Im Bereich der Enden der molecular beacons befinden sich eine fluorophore Gruppe Fl1, Fl2, Fl3 sowie in gegenüberliegender Anordnung ein Quencher Q1, Q2, Q3.

Sobald eine ausreichende Anzahl erster Nukleinsäuresequenzen N(I)1-n durch Amplifikation hergestellt worden ist, kommt es zur spezifischen Hybridisierung des Identifizierungssequenzabschnitts IDS1-n mit dem dazu komplementären Nachweissequenzabschnitt IDP1-n. Dabei wird die räumliche Beziehung zwischen dem Quencher Q1, Q2, Q3 und der fluorophoren Gruppe Fl1, Fl2, Fl3 aufgehoben. Eine spezifische Fluoreszenz ist beobachtbar (Fig. 3d).

Durch die Verwendung verschiedener Fluorophore Fl1, Fl2, Fl3 in den molecular beacons MB ist eine Unterscheidung von verschiedenen Identifizierungssequenzabschnitten IDS1-n möglich.

Bei der in Fig.4a - c gezeigten Verfahrensvariante wird die Amplifikation mit einem ersten Primer P1 durchgeführt, der mit einer fluorophoren Gruppe Fl1 markiert ist. Bei der Verwendung von Nukleinsäuresequenzen mit identischem Identifikationssequenzabschnitt IDS kann eine Unterscheidung durch die Benutzung unterschiedlicher Primerbindungssequenzabschnitte erfolgen, die jeweils mit spezifischen fluorophoren Gruppen markiert sind.

Zur Identifikation des Identifikationssequenzabschnitts IDS wird die bei der Amplifikation mit der fluorophoren Gruppe F11 hergestellte Nukleinsäuresequenz mit einer komplementären Nachweisnukleotidsequenz IDP in Kontakt gebracht, die an einem vorgegebenen Ort einer festen Oberfläche gebunden ist. Die dann an dem vorgegebenen Ort auftretende Fluoreszenz kann mittels eines herkömmlichen Nachweisgeräts erfaßt werden (siehe Fig. 5a - c).

- 10 Nach einer weiteren Verfahrensvariante sind die Nukleinsäuresequenzen N1-n mit Kopplungsgruppen verbunden, die eine Bindung an weitere Substanzen ermöglichen. Zu diesen Kopplungsgruppen gehören Biotin, Aminolinker, Thiolgruppen oder Haptene, wie Digoxigenin. Mit diesen Kopplungsgruppen kann die Nukleinsäuresequenz N1-n an spezifisch zu markierende Moleküle gebunden und/ oder markiert werden.

Es können mittels der allgemein mit KG bezeichneten Kopplungsgruppen unterschiedliche Antikörper mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz N1-n eindeutig markiert werden. Die Bindung kann über ein ProteinA/Streptavidin-Fusionsprotein vermittelt werden. Dieses Protein bindet die konstante Region von Antikörpern und vermittelt eine Affinität zu Biotin. Biotinylierte Nukleinsäuresequenzen binden an solche Antikörper. Damit ist eine Selektion möglich. In den Fig. 6 a - d ist eine solche Selektion gezeigt. Antikörper A, B, C, D und Z sind mit den Nukleinsäuresequenzen N1, N2, N4, N49 und Nn markiert. Die Antikörper A, B, C, D und Z werden mit einer Matrix in Kontakt gebracht, auf der verschiedene Antigene A', C', X', D' und Y' fixiert sind. Die Antikörper A, C, D, deren Antigen A', C' und D' auf der Matrix fixiert ist, werden spezifisch gebunden (Fig. 6b). Nach dem Entfernen der nicht an die Matrix gebundenen Antikörper B, Z durch Wa-

schen können die Nukleinsäuresequenzen N1, N4 und N49 mit markierten Primern amplifiziert werden (Fig. 6c bzw. Fig. 5a). Die amplifizierten Nukleinsäuresequenzen N1, N4, N49 werden mit einer Detektor-Oberfläche in Kontakt gebracht, auf der die die Nachweissequenzabschnitte IDP enthaltenden weiteren Nukleinsäuresequenzen N1-n gebunden sind. Dabei nimmt jede weitere Nukleinsäuresequenz N'1-n eine bestimmte vorgegebene Position auf der Detektor-Oberfläche ein (siehe Fig. 6d).

10

In Fig. 7a - f ist in Form eines Flußdiagramms die Herstellung und Identifizierung eines komplexen Codes gezeigt. Es werden 50 verschiedene Nukleinsäuresequenzen benutzt. Die 50 Nukleinsäuresequenzen werden in 5 Gruppen zu je 10 Nukleinsäuresequenzen unterteilt (Fig. 7b). Jeder Nukleinsäuresequenz einer Gruppe wird eine Ziffer von 0 bis 9 zugeordnet (Fig. 7c). Jeder Gruppe von Nukleinsäuresequenzen wird eine Stelle einer 5 stelligen Zahl zugeordnet (Fig. 7d).

20 Zur Herstellung des Codes wird jeder Gruppe der 5 Gruppen genau eine Nukleinsäuresequenz entnommen und diese zur Markierung verwendet (Fig. 7e). Jede Mischung aus den entnommenen 5 Nukleinsäuresequenzen definiert somit eine Zahl zwischen 0 und 99999. Die Identifikation des Zahlenwerts erfolgt durch die Identifikation der 5 Nukleinsäuresequenzen (Fig. 7f).

30 Nach einer weiteren Ausführungsvariante des Verfahrens können die Nukleinsäuresequenzen N1-n an Partikel P gebunden werden. Die Bindung erfolgt vorzugsweise über aktivierte oder aktivierbare Gruppen. Zu diesen Gruppen gehören Biotin, Aminolinker, Thiolgruppen oder Haptene, wie Digoxigenin. Als Partikel P können Polystyryl-, Silica-, Polyvinylchlorid-, Polyethylen-, Nylon oder Glasmilch-Partikel verwendet werden. Auch

aus Virushüllen oder virus-like-particles bestehende Partikel können Verwendung finden. Die Partikel P können auch aus Stoffen hergestellt sein, die DNA komplexieren, wie z.B. Polylysin oder DNA-bindende Proteine.

5 Die Partikel P können mit mehreren Nukleinsäuresequenzen N1-n markiert sein. Ein Partikel P kann somit einen Zahlencode nach dem vorgenannten Beispiel tragen. In den Fig. 8a-d ist die Herstellung eines markierten Partikels P beispielhaft
10 dargestellt. Die Nukleinsäuresequenz N1-n trägt an ihrem einen Ende eine Biotingruppe (Fig. 8a). Verschiedene solcher biotinyliarten Nukleinsäuresequenzen werden im gleichen molaren Verhältnis gelöst (Fig. 8b). Zur Lösung wird eine vorgegebene Menge an Partikeln P gegeben, die beispielsweise mit
15 Streptavidin beschichtet sind (Fig. 8c). Es bildet sich zwischen Biotin und Streptavidin eine Bindung. Die Nukleinsäuresequenzen N1-n werden so auf dem Partikel P gebunden (Fig. 8d). Es können auf dem Partikel P selbstverständlich mehrere Nukleinsäuresequenzen N1-n des gleichen Typs gebunden sein.
20 Das erhöht die Reaktionssicherheit bei der Amplifikation.

Die Partikel P besitzen vorzugsweise eine Größe von 1 µm bis 100 µm. Sie können fluoreszierend oder durch eine Bindungsreaktion mit anderen Stoffen fluoreszenzmarkiert sein. Durch
25 ihre Größe und fluoreszente Eigenschaft können die Partikel P mittels eines Partikel-Sortierers sortiert und isoliert werden. Das ermöglicht die Identifizierung von Numerierungen einzelner Partikel P, die Teil einer Mischung mehrerer Partikel P sind.

30 Nach einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung können auch die Partikel P Kopplungsgruppen KG aufweisen, die zur Bindung an die zu markierende Substanz geeignet ist (Fig. 9a). Zu

diesen Gruppen gehören Biotin-, Aminolinker-oder Thiolgruppen. Sie können beispielsweise am Ende der Nukleinsäuresequenz N1-n angebracht sein. Die Kopplungsgruppen KG werden an den Partikel vorzugsweise über Spacermoleküle L gebunden
5 (Fig. 9b).

Fig. 9c zeigt ein Partikel P mit freien Kopplungsgruppen KG. Fig. 9d zeigt ein Partikel P, bei dem Substanz S an die Kopplungsgruppen KG gebunden ist.

10 Die Substanz S1-n kann beispielsweise mit einem potentiellen Rezeptor R umgesetzt werden (Fig. 10a). Der Rezeptor R kann mit einem fluorophoren Molekül markiert sein (Fig. 10b). Partikel P, die einen Liganden des Rezeptors R tragen, werden
15 vom Rezeptor R gebunden. Die den Rezeptor R aufweisenden Partikel P können aufgrund ihrer Größe und Fluoreszenz mittels eines Fluoreszenz-aktivierten Partikel-Sortierers von Partikeln P getrennt werden, die keinen Rezeptor R gebunden haben (Fig. 10c). Die Identifizierung der gebunden Substanz kann
20 anhand des Identifikationssequenzabschnitts IDS der Nukleinsäuresequenz N1-n erfolgen.

Bezugszeichenliste

	N1-n	Nukleinsäuresequenz
	N'1-n	weitere Nukleinsäuresequenz
5	IDS1-n	Identifizierungssequenzabschnitt
	IDP1-n	Nachweissequenzabschnitt
	IDS-A, IDS-B	Teilabschnitt
	PBS1	erster Primerbindungssequenzabschnitt
	PBS2	zweiter Primerbindungssequenzabschnitt
10	KG, A, B, C, D, Z	Kopplungsgruppen
	L	Spacermolekül
	S	Substanz
	R	Rezeptor
	F11	fluorophore Gruppe
15	P	Partikel

Patentansprüche

1. Verfahren zur Markierung und Identifizierung von festen, flüssigen und gasförmigen Substanzen (S1-n),

5

wobei zur Markierung aus einer ersten Gruppe vorgegebener jeweils einen Identifizierungssequenzabschnitt (IDS1-n) aufweisenden Nukleinsäuresequenzen (N1-n) mindestens eine ausgewählt und zur Substanz (S1-n) hinzugefügt wird,

10

wobei zur Identifizierung eine zweite Gruppe weiterer Nukleinsäuresequenzen (N'1-n) vorgesehen ist, die jeweils einen zu einem der Identifizierungssequenzabschnitte (IDS1-n) komplementären Nachweissequenzabschnitt (IDP1-n) aufweisen,

15

wobei erste Schmelzpunkte von aus den Identifizierungssequenzabschnitten (IDS1-n) mit den dazu komplementären Nachweissequenzabschnitten (IDP1-n) gebildeten Hybriden sich um höchstens 5°C voneinander unterscheiden und

20

zweite Schmelzpunkte von aus den Identifizierungssequenzabschnitten (IDS1-n) und Nachweissequenzabschnitten (IDP1-n) gebildeten nicht vollständig komplementären Hybriden um mehr als 5°C niedriger sind als der niedrigste der ersten Schmelzpunkte und

25

wobei zur Identifizierung die aus der ersten Gruppe ausgewählte/n Nukleinsäuresequenz/en (N1-n) mit den weiteren Nukleinsäuresequenzen (N'1-n) der zweiten Gruppe unter vorgegebenen Hybridisierungsbedingungen in Kontakt gebracht und die Hybridisierung nachgewiesen wird.

30

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Identifizierungssequenzabschnitt (IDS1-n) zwischen zwei Primerbindungssequenzabschnitten (PBS1, PBS2) sich befindet.

35

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei jeweils zwei Nukleinsäuresequenzen (N1-n) einen Teilabschnitt (IDS-A, IDS-B) eines gemeinsamen Identifizierungssequenzabschnitts (IDS1-n)
5 an ihrem 5'-Ende aufweisen und an den Teilabschnitt (IDS-A, IDS-B) ein Primerbindungssequenzabschnitt gebunden ist.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die Teilabschnitte (IDS-A, IDS-B) teilweise komplementär zueinander sind.
10
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Primerbindungssequenzabschnitte (PBS1, PBS2) den gleichen Schmelzpunkt aufweisen.
- 15 6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nukleinsäuresequenzen (N1-n), vorzugsweise mittels PCR und unter Verwendung fluoreszierender Primer, amplifiziert werden.
- 20 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nukleinsäuresequenzen (N1-n) an mindestens einem Ende mit einem Stoff verbunden sind, welcher einem durch Exonuklease bedingten Abbau entgegenwirkt.
- 25 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nukleinsäuresequenz (N1-n) mit einer Kopplungsgruppe (A, B, C, D - Z) versehen ist.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
30 die Kopplungsgruppe (A, B, C, D - Z) aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Biotin-, Amino-, Thiol-Gruppe oder Hapten.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
35 an die Nukleinsäuresequenz (N1-n) ein eine fluorophore Gruppe (F11-n) tragendes Molekül gebunden ist.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Kopplungsgruppe (A, B, C, D, - Z) mit einer fluorophoren Gruppe markiert ist.
- 5
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nukleinsäuresequenzen (N1-n) an die Substanz (S1-n) gebunden und als Substanz (S1-n) einer der folgenden Stoffe verwendet wird: Antikörper, Lektine, Rezeptoren, Nukleotid-
- 10 Sequenzen, PNA-Sequenzen, Peptide, Proteine, Zucker, Liganden.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nukleinsäuresequenzen (N1-n) an Partikel (P) gebunden
- 15 oder darin eingeschlossen sind.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Partikel (P) eine Größe von 30 nm bis 3 µm aufweisen.
- 20 15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Partikel (P) Silica-, Polystyrol-, Polyvinylchlorid-, Polyethylen, Nylon- oder Glasmilch-Partikel sind.
16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
- 25 das Partikel (P) ein virales Kapsid oder ein virus-like-particle ist.
17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei jede der weiteren Nukleinsäuresequenzen (N'1-n) an einem vor-
- 30 gegebenen Ort einer festen Oberfläche, vorzugsweise auf einem Chip, einer Mikrotiterplatte oder Folie, gebunden ist.
18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Hybridisierung eines Identifizierungssequenzabschnitts

(IDS1-n) mit einem komplementären Nachweissequenzabschnitt (IDP1-n) mittels Fluoreszenz nachgewiesen wird.

19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
5 mindestens zwei Nukleinsäuresequenzen (N1-n) als Markierung der Substanz (S1-n) zugefügt werden.

20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
10 die Nukleinsäuresequenzen (N1-n) und/oder die weiteren Nukleinsäuresequenzen (N'1-n) synthetisch hergestellt werden.

21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
15 anstatt der Nukleinsäuresequenzen bzw. der weiteren Nukleinsäuresequenzen Chimäre aus Nukleinsäuren und Nukleinsäureanaloge, wie PTO oder PNA, verwendet werden.

1/10

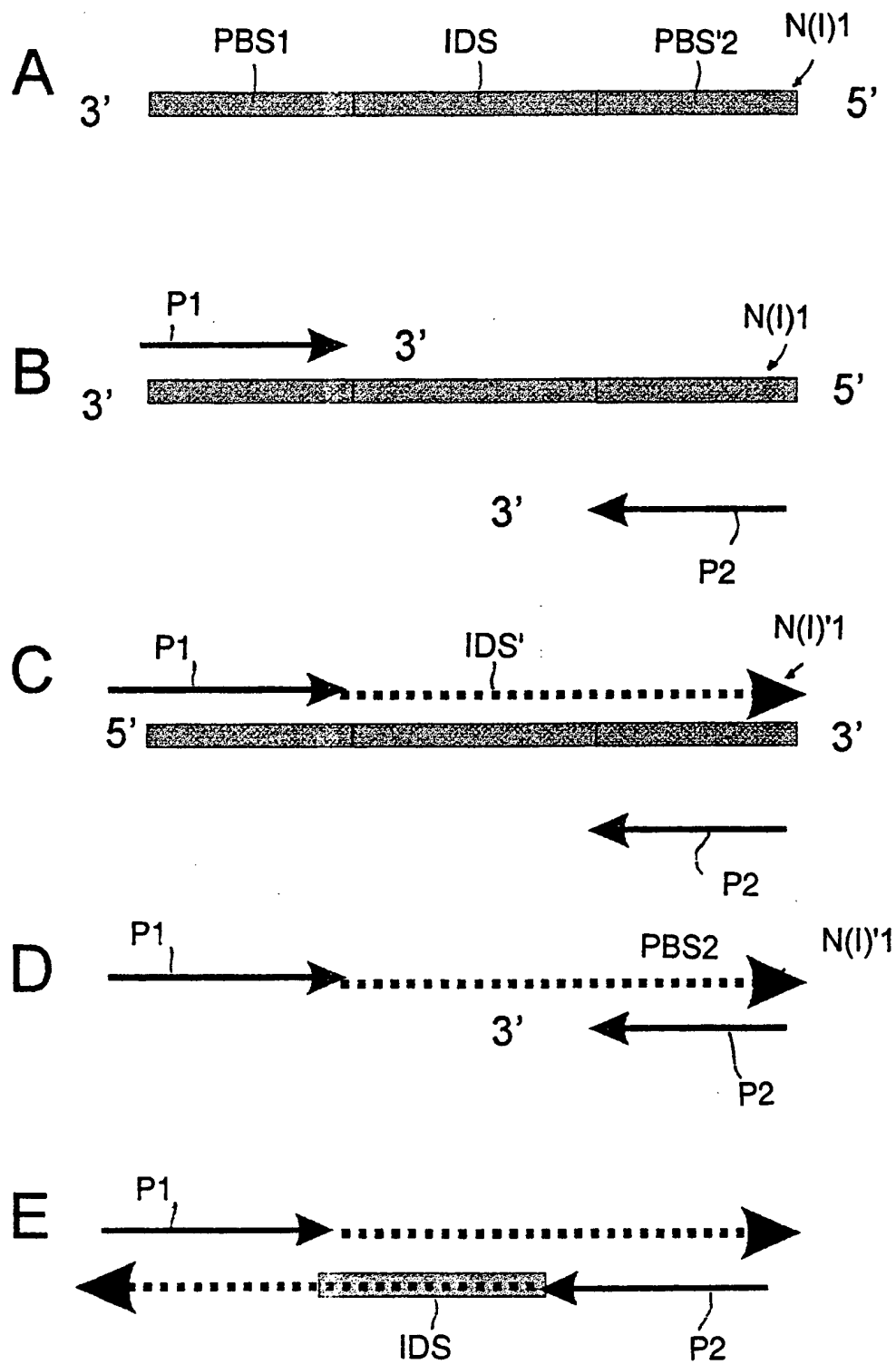
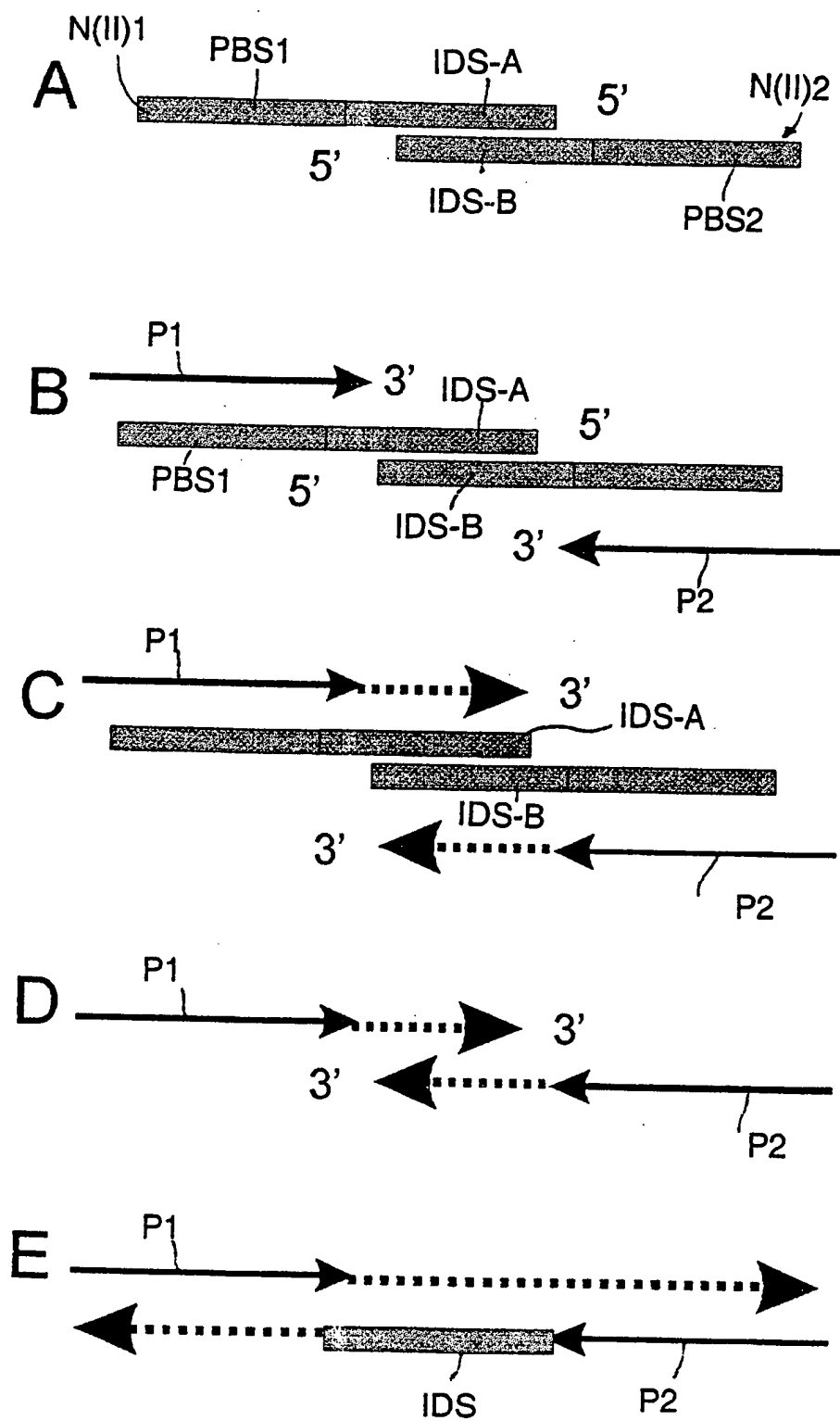


Fig. 1

2/10



3/10

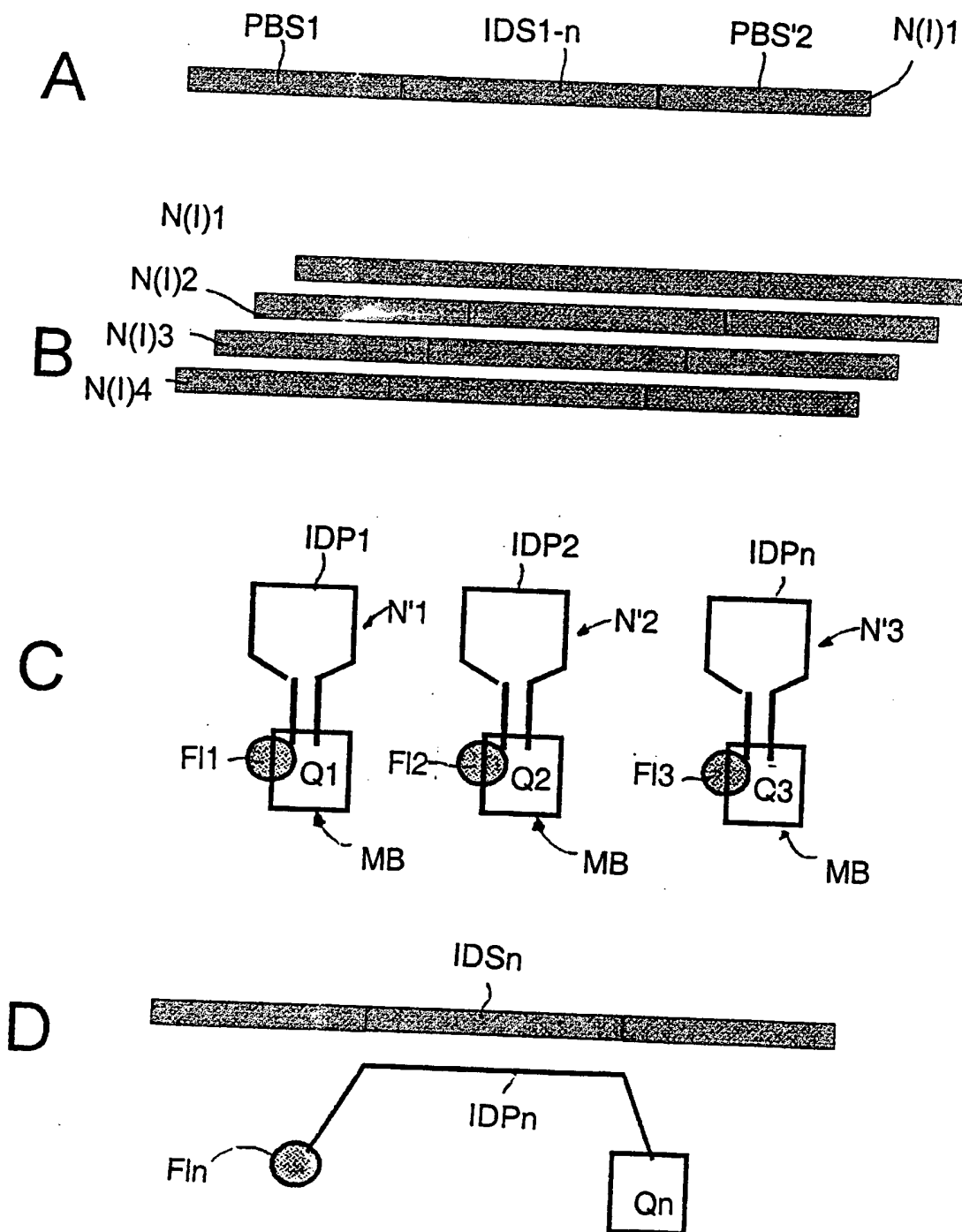


Fig. 3

4/10

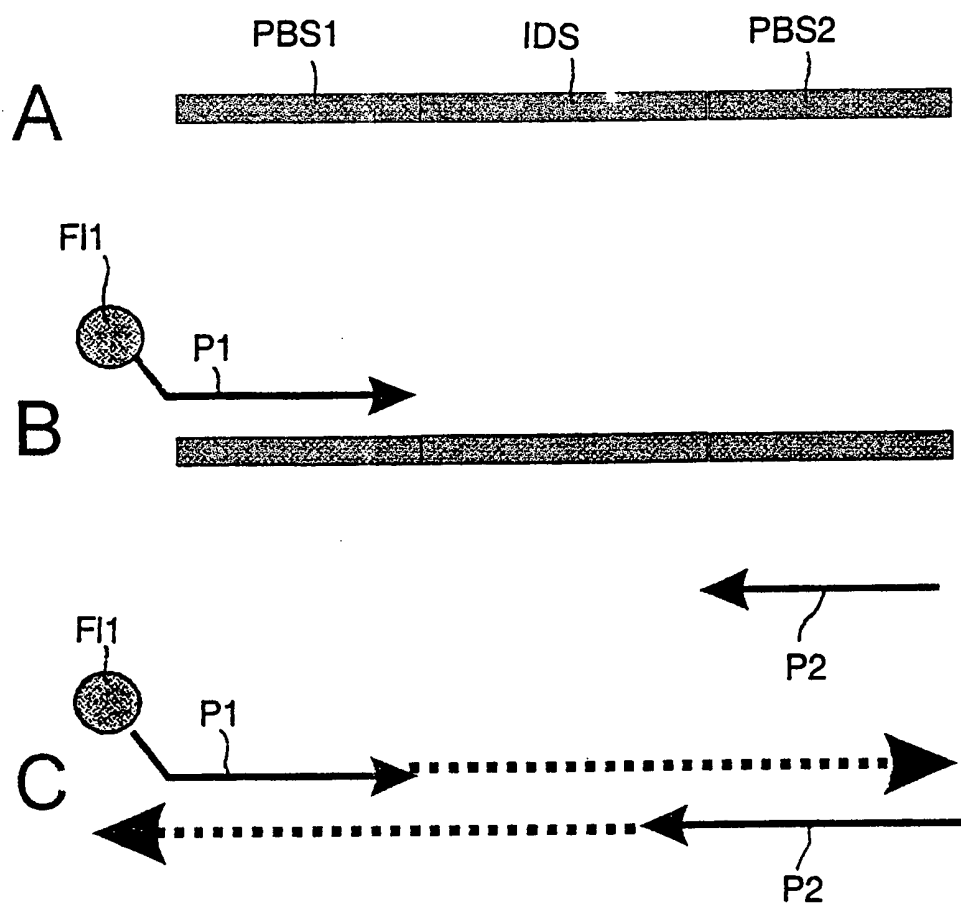


Fig. 4

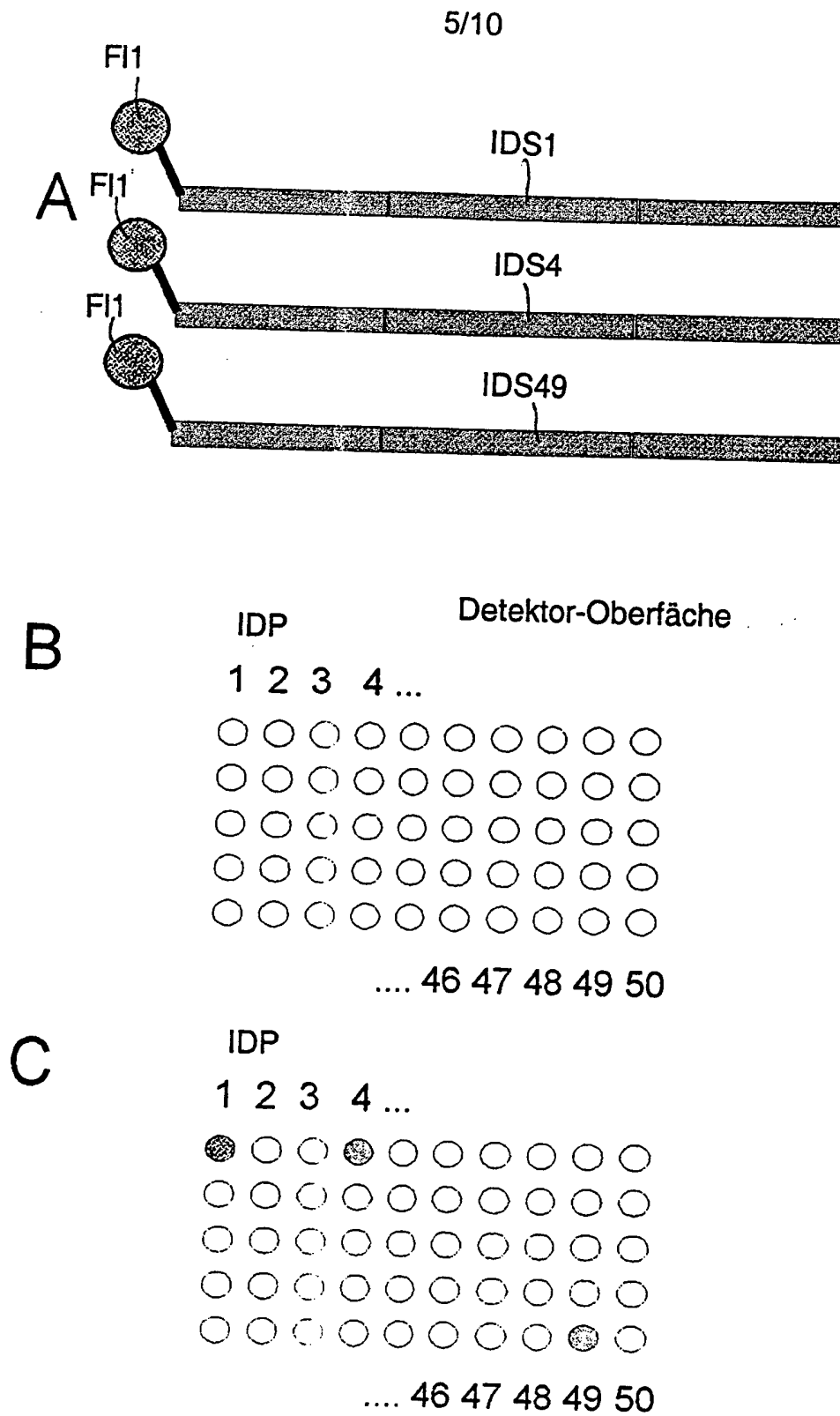
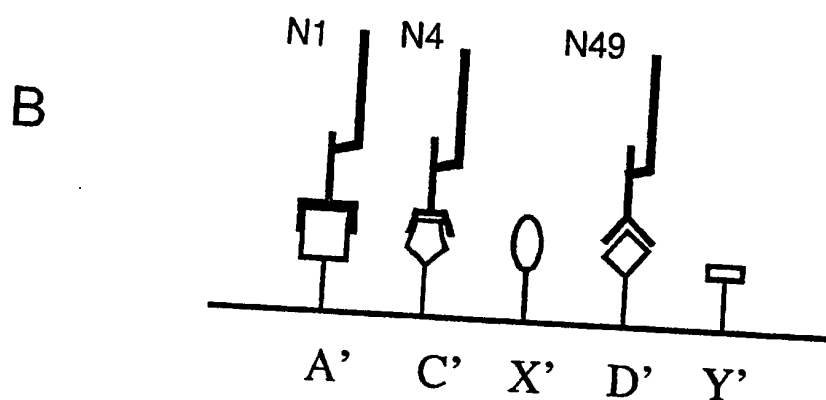
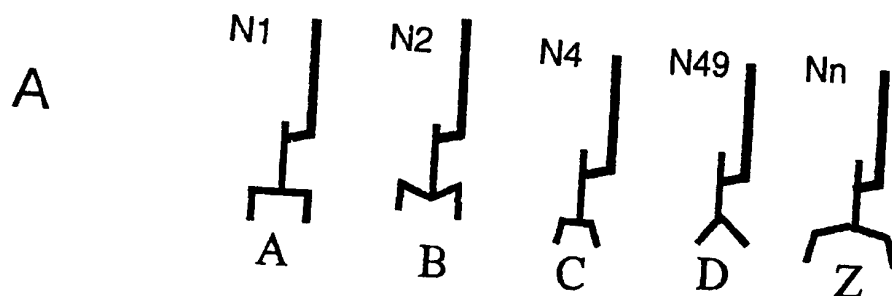


Fig. 5

6/10



C Amplifikation mit markierten Primern

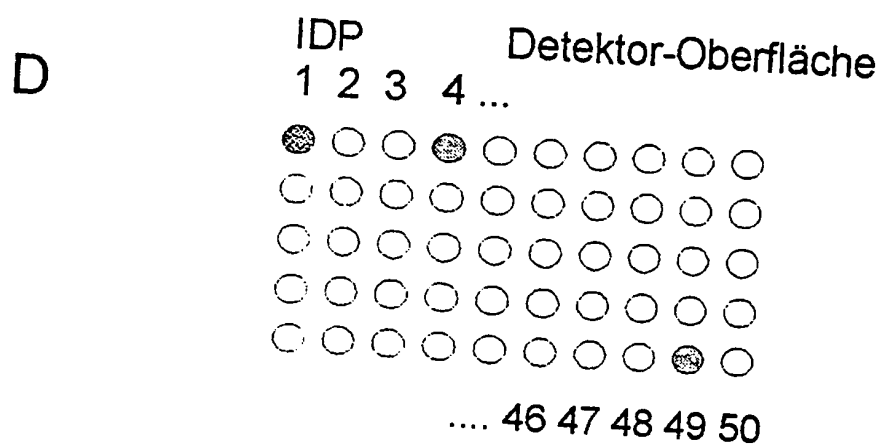


Fig. 6

7/10

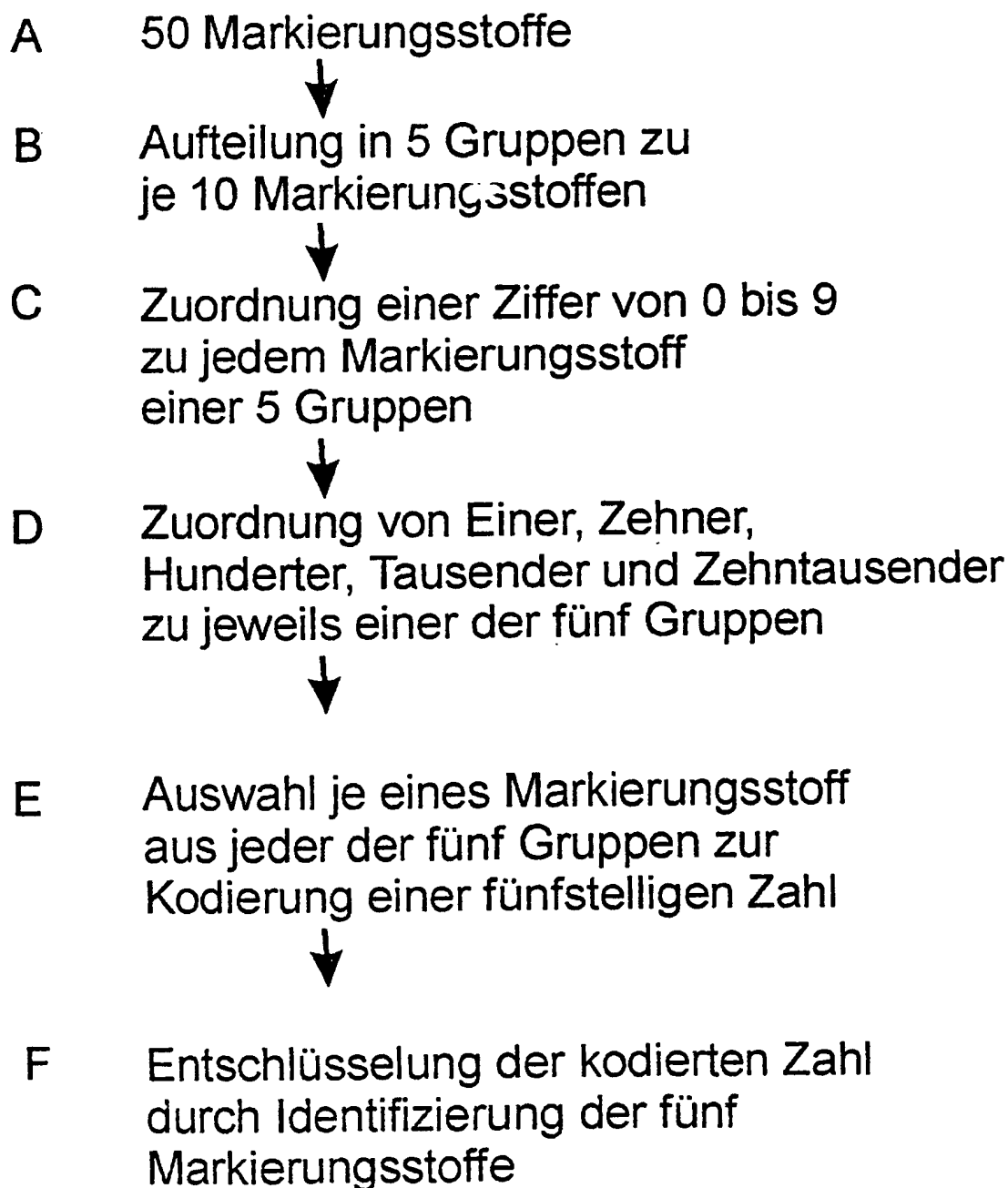


Fig. 7

8/10

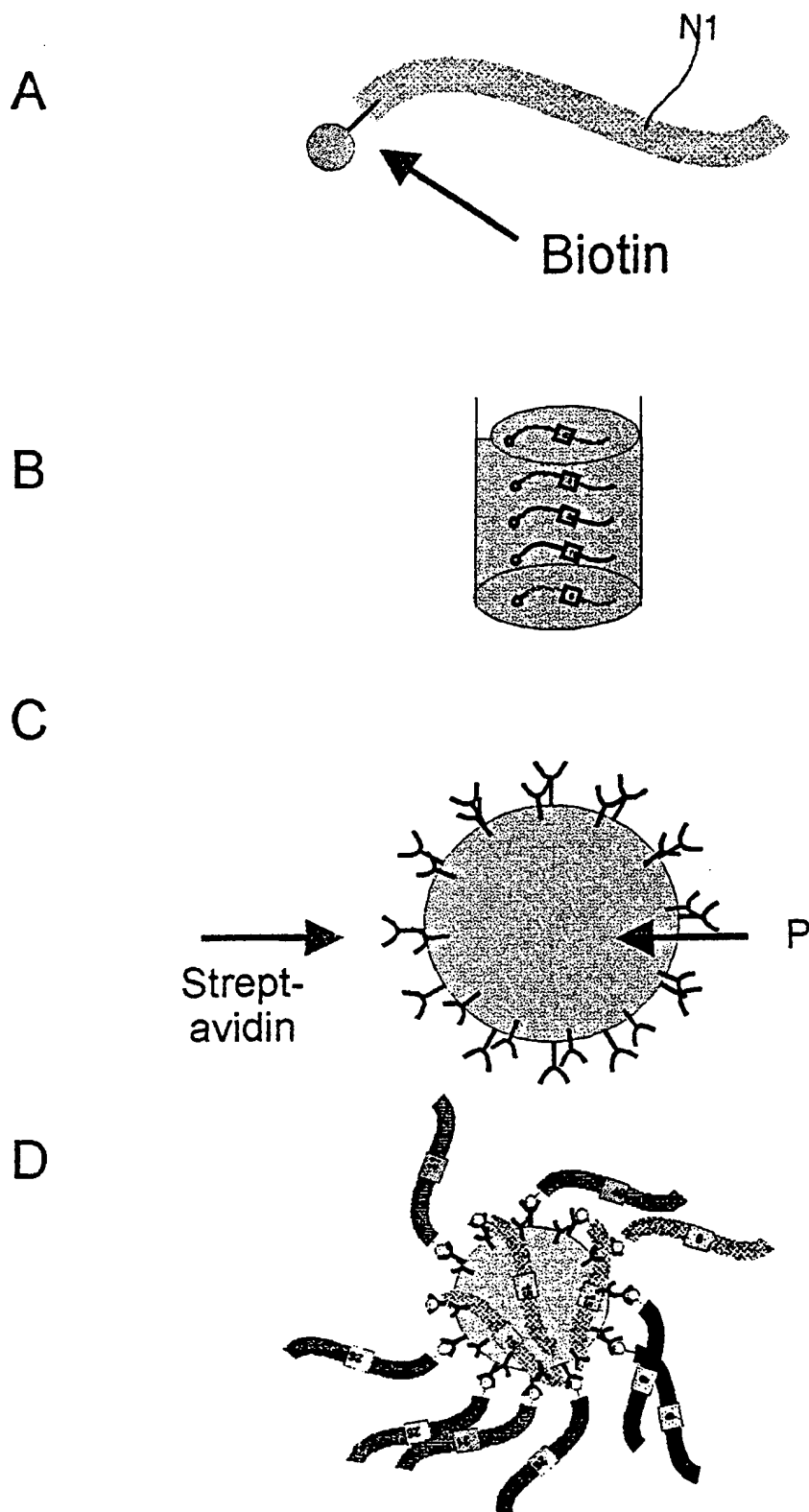


Fig. 8

9/10

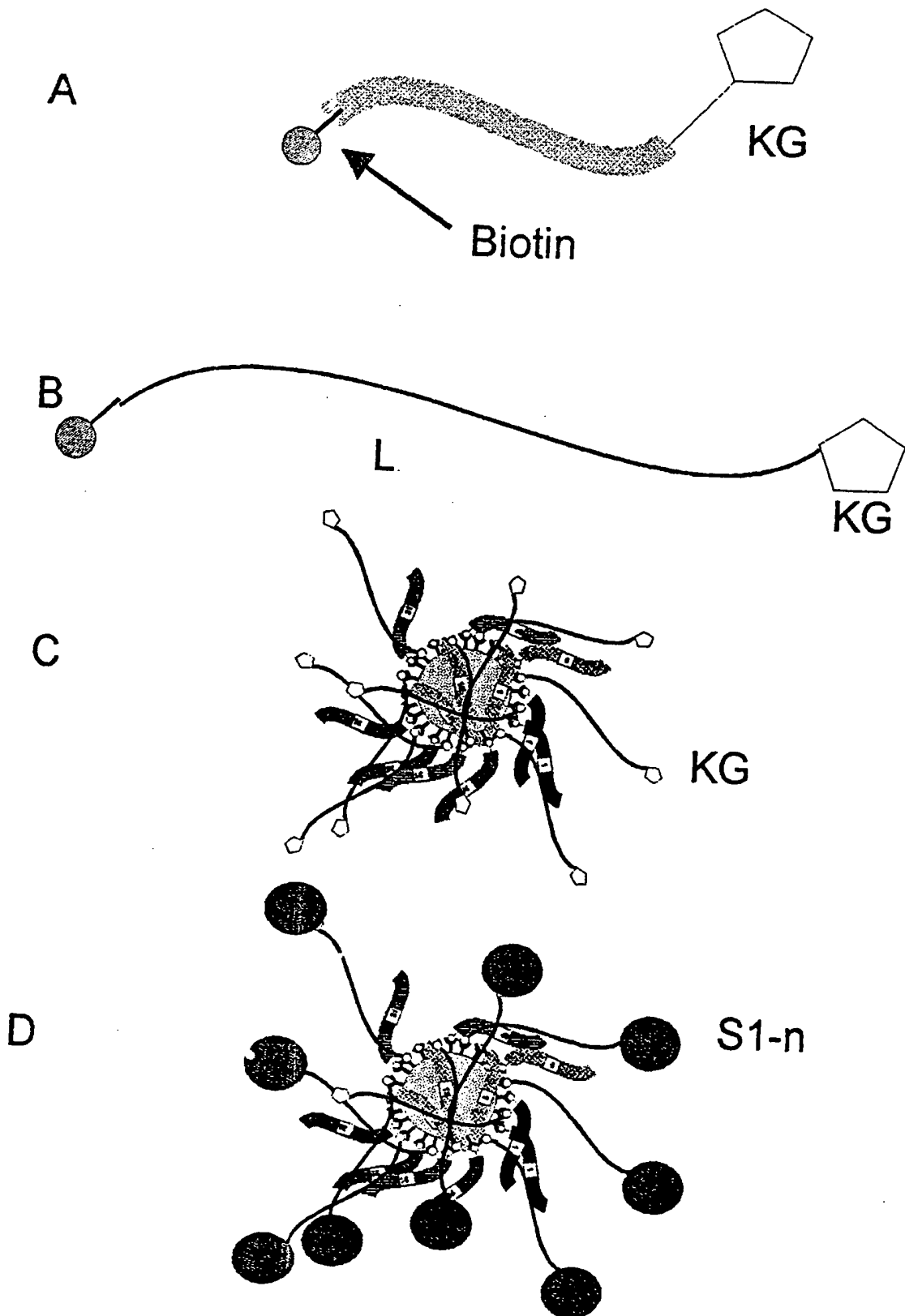


Fig. 9

10/10

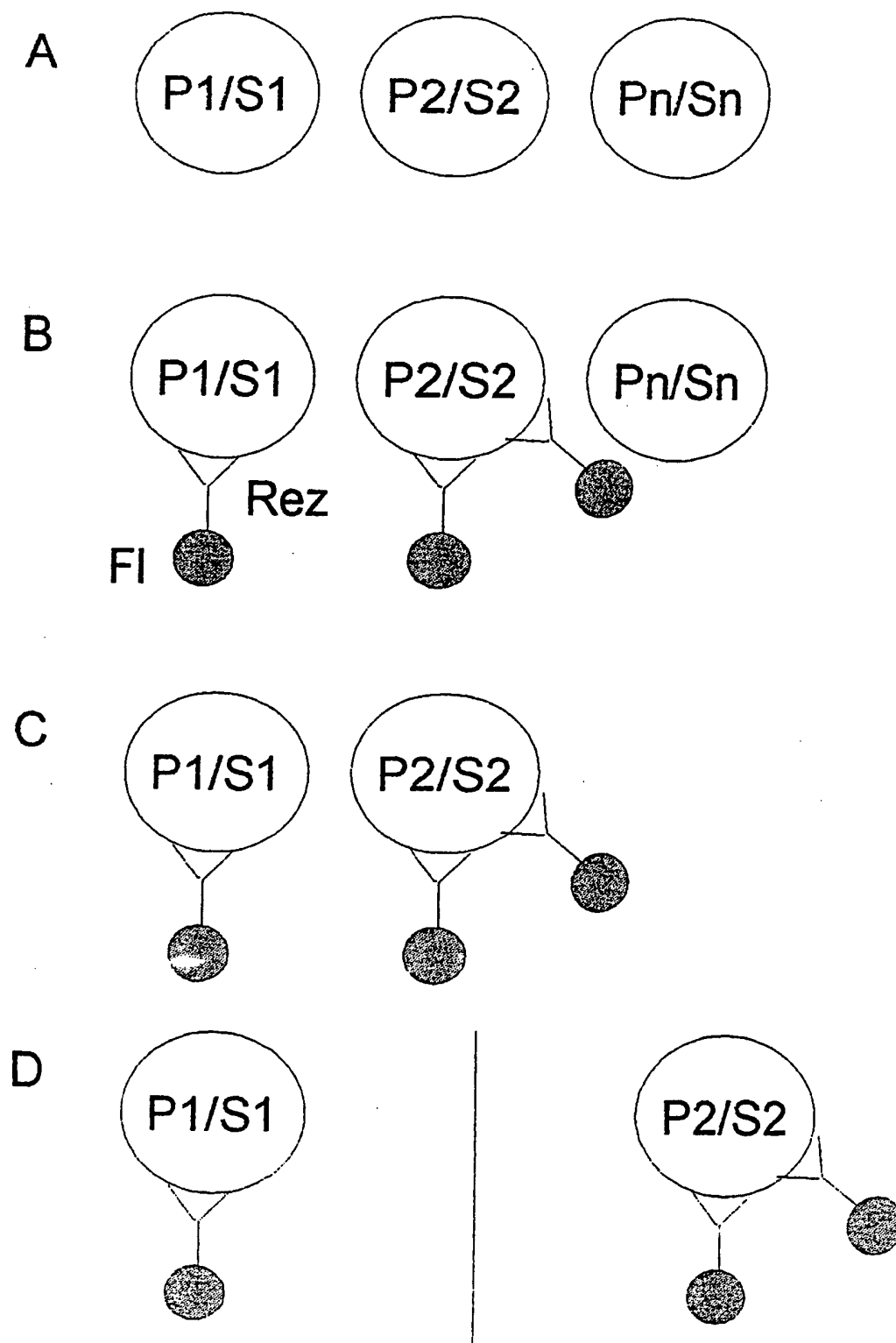


Fig. 10